

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- 6 • **BLACK BORDERS**
 - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - FADED TEXT
 - ILLEGIBLE TEXT
 - SKEWED/SLANTED IMAGES
 - COLORED PHOTOS
- 6 • **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
 - GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

18 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 44 31 598 A 1

51 Int. Cl. 8:
C 12 N 11/04
C 12 N 5/00

21 Aktenzeichen: P 44 31 598.8
22 Anmeldetag: 5. 9. 94
23 Offenlegungstag: 7. 3. 98

DE 44 31 598 A 1

71 Anmelder:
Sittinger, Michael, 91056 Erlangen, DE; Bujla, Jésus,
Dr., 80689 München, DE

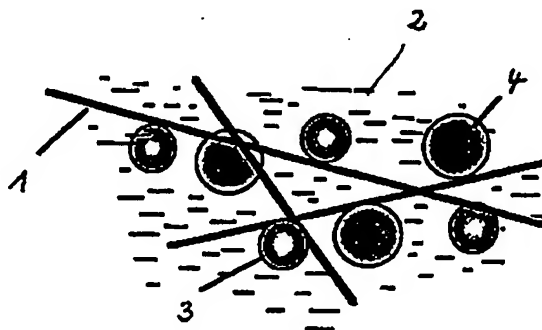
74 Vertreter:
Haft, von Puttkamer, Berngruber, Czybulka, 81669
München

61 Zusatz zu: P 43 06 661.5

72 Erfinder:
gleich Anmelder

54 Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen

57 Bei dem vorgeschlagenen Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen wird die dreidimensionale Trägerstruktur, in die Zellen angelagert sind, zunächst ummantelt und anschließend mit einer Nährlösung perfundiert, über die die Zellen ernährt werden. Mit der Erfindung wird vorgeschlagen, in die Trägerstruktur resorbierbare Mikrokörper, z. B. poröse Mikrokugeln (4) einzubetten, die bei der Resorption die Gewebebildung beeinflussende Faktoren, z. B. entzündungshemmende Antibiotika freigeben. Die Ausbildung der interzellulären Matrix kann auch dadurch verbessert werden, daß die Zellen mit einer Suspension in die Trägerstruktur eingebracht werden, die aus extrazellulären Matrixkomponenten bzw. analogen Materialien besteht.



DE 44 31 598 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wie dieses im Hauptpatent ... (Patentanmeldung P 43 06 661.5) beschrieben ist. Bei diesem Verfahren werden die Zellen auf eine im implantierten Zustand resorbierbare Trägerstruktur aufgebracht, wobei als Trägerstruktur eine dreidimensionale, im wesentlichen formstabile und entsprechend der gewünschten Form des Implantates vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen verwendet wird. In den inneren Hohlraum dieser Trägerstruktur werden die Zellen eingebracht, wonach anschließend die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einem Material ummantelt wird, durch die eine Nährlösung in das Innere der Trägerstruktur hindurchströmen, vorzugsweise hindurchdiffundieren, kann. Das gesamte Gebilde der ummantelten Trägerstruktur mit den aufgenommenen Zellen wird anschließend mit einer Nährlösung zumindest solange perfundiert, d. h. durchströmt, bis sich zumindest teilweise eine die Zellen aneinanderbindende interzelluläre Matrix ausgebildet hat. Anschließend wird die Trägerstruktur implantiert, die allmählich im Körper resorbiert wird, wobei sich gleichzeitig die Zellenmatrix weiterbildet.

Das Material für die Ummantelung der Trägerstruktur wird hierbei so gewählt, daß die für den Aufbau der interzellulären Matrix notwendigen Zellenprodukte, insbesondere Kollagene und Proteoglykane im Inneren der Trägerstruktur zurückgehalten werden und aus dem Zellverband nicht ausgeschwemmt werden. Als Material für diese Umhüllung ist z. B. Agarose geeignet. Auch andere Materialien können in Betracht gezogen werden, sofern sie die gewünschten Eigenschaften nach Art einer semipermeablen Membran aufweisen.

Als Trägerstruktur wird vorzugsweise ein dreidimensionales Vlies aus Polymerfasern verwendet, wobei die Fasern selbstverständlich noch vorbereitet werden können, um die Adhäsion von Zellen zu begünstigen.

Ferner ist es vorteilhaft, die Zellen in einer Suspension mit der Nährlösung in die Trägerstruktur einzubringen, wobei zusätzlich die Suspension mit einem Fremdmaterial, wiederum etwa Agarose versetzt wird. Dieses Fremdmaterial erhöht zum einen die Viskosität der Suspension, dient jedoch zum anderen auch dazu, intensiv vermehrte Knorpelzellen, die sich in ihrer Form verändert haben und mehr Fibroblasten ähneln, wiederum zu Knorpelzellen zu redifferenzieren. Für eine solche "Rückbildung" benötigen die Zellen ein umgebendes Medium, z. B. die erwähnte Agarose.

Bei dem beschriebenen Verfahren können zwei Phasen der Implantatentwicklung unterschieden werden. Als erste Phase kann man die Vorformung bzw. Konditionierung des Gewebes in vitro betrachten. Die zweite Phase hingegen umfaßt die Reifung und Einheilung des Gewebes in vivo, d. h. nach der Implantation. Wie im Hauptpatent erwähnt, besteht während der ersten Phase prinzipiell die Möglichkeit, die Gewebeentwicklung zu steuern, indem vorzugsweise über das Perfusionsystem bestimmte Bedingungen und Faktoren, wie z. B. Zugabe von Serum oder gewebemorphogener Proteine, vorgegeben werden. Nach der Transplantation in vivo besteht jedoch derzeit keine Möglichkeit mehr, die Gewebebildung zu beeinflussen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das in dem Hauptpatent angegebene Verfahren zu verbessern und

insbesondere die Gewebebildung durch zusätzliche Maßnahmen zu begünstigen.

Mit der Erfindung wird hierzu vorgeschlagen, in die Trägerstruktur resorbierbare Mikrokörper einzubetten, in denen die Gewebebildung beeinflussende Faktoren aufgenommen sind, die ihrerseits bei der allmählichen Resorption der Mikrokörper freigegeben werden. Als Mikrokörper können z. B. poröse Mikrokugeln mit einem Durchmesser zwischen etwa 10 und 200 Mikrometern, vorzugsweise zwischen 20 und 50 Mikrometern, aus einem resorbierbaren Material, z. B. aus Polylactid verwendet werden, in die die gewünschten Faktoren zur Gewebedifferenzierung oder zur Entzündungshemmung eingebunden sind. Derartige Faktoren können z. B. Peptid-Faktoren, z. B. entzündungshemmende Cyclopeptid-Antibiotika, wie Gycolsporin A, oder geeignete rekombinante gewebemorphogene Proteine sein, die im Transplantat langsam, d. h. über mehrere Monate hinweg, freigesetzt werden. Wenn die Mikrokörper, z. B. die erwähnten porösen Mikrokugeln, in ihrer Größe den Zellen ähneln, können diese beim Kulturansatz der Zellsuspension beigemischt werden und so in gleicher Weise wie die Zellen im Polymervlies verteilt werden. Die Degradation der Mikrokörper muß bei der Herstellung so eingestellt werden, daß sich die Freisetzung der Faktoren über die gewünschte Zeit, z. B. mehrere Monate, erstreckt.

Wie oben erwähnt, ist es vorteilhaft, neben der resorbierbaren Trägerstruktur, insbesondere aus einem Polymervlies, auch noch ein Fremdmaterial, z. B. Agarose, einzusetzen. Anstelle der Agarose können auch andere Materialien verwendet werden, die eine semipermeable Membran um die Trägerstruktur mit den oben erwähnten günstigen Eigenschaften aufweisen. Besonders vorteilhaft sind hierbei Hydrogele aus extrazellulären Matrixkomponenten zu verwenden, vorzugsweise etwa ein Copolymer aus Chondroitinsulfat, z. B. Chondroitin-4-sulfat und Kollagen, z. B. Kollagen Typ II, und/oder Hyaluronsäure. Chondroitinsulfate und Hyaluronsäure sind die Hauptbestandteile der Binde- und Stützgewebesubstanz und auch im Knorpelgewebe, dort allerdings mit einem speziellen Protein verknüpft, vorhanden. Diese knorpeltypischen Matrixkomponenten können eine Redifferenzierung der Zellen beschleunigen und stellen geeignete Bausteine für die Neubildung der extrazellulären Matrix zur Verfügung. Es ist auch denkbar, derartige Komponenten synthetisch herzustellen. Weitere Fremdmaterialien für die Trägerstruktur sind z. B. Glykosaminoglykane bzw. Kollagen-GAG-Copolymere, in die die Zellen suspendiert sind. Neben dem erwähnten Chondroitinsulfat und dem Kollagen ist auch ein Keratansulfat denkbar. Statt der natürlichen Kollagene oder Proteoglykane können auch synthetische Polypeptide, z. B. Polylysin oder Polysaccharide verwendet werden. Hierbei ist es sogar denkbar, die Trägerstruktur fortzulassen, wenn es gelingt, nach dem Herstellen der Zellsuspension die extrazellulären Matrixkomponenten in geeigneter Weise zu vernetzen, z. B. durch Bestrahlung mit UV-Licht. An diese vernetzte Struktur können sich dann die Zellen anlagern.

Die Erfindung ist in Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung näher erläutert. In dieser stellen dar

Fig. 1 einen Ausschnitt aus einer Trägerstruktur mit daran angelagerten Zellen sowie Mikrokugeln, die in Molekülen einer extrazellulären Matrix suspendiert sind;

Fig. 2 eine schematische Schnittzeichnung der verwendeten Mikrokugeln.

Eine in Fig. 1 nur im Ausschnitt gezeigte dreidimensionale Trägerstruktur aus Polymerfasern 1 wird mit einer Suspension 2 getränkt, in der Zellen 3, in diesem Fall Knorpelzellen, und poröse Mikrokugeln 4, die etwa die gleiche Größe wie die Zellen haben, suspendiert sind. Die Suspension 2 besteht entweder aus Agarose und/oder einem der oben genannten Fremdmaterialien, d. h. z. B. extrazellulären Matrixkomponenten, die Bausteine für die Bildung der extrazellulären Matrix liefern.

Die nach der Implantation des Implantates resorbierbaren Mikrokugeln 4 weisen, wie schematisch in Fig. 2 dargestellt ist, kleine Hohlräume 5 auf, in die die Gewebebildung beeinflussende Faktoren, z. B. entzündungshemmende Faktoren wie Antibiotika etc. eingebunden sind. Bei der allmählichen Resorption der Mikrokugeln werden dann diese Faktoren verzögert freigegeben.

Die gesamte Trägerstruktur wird noch mit einer Hülle, z. B. der erwähnten Agarose ummantelt, wonach anschließend, wie im Hauptpatent beschrieben, die derart vorbereitete Trägerstruktur in eine Perfusionsapparatur eingesetzt und mit Nährlösung durchströmt wird. Anstatt die Trägerstruktur mit Agarose oder einem anderen Hydrogel zu ummanteln, ist es auch möglich, die Trägerstruktur mit Polyelektrolytkomplexen zu verkapseln, die ebenfalls bei geeigneter Zusammensetzung die Eigenschaften einer semipermeablen Membran aufweisen, d. h. für den hier gewünschten Zweck die Diffusion mit Nährlösung ermöglichen, jedoch das Ausschwemmen von extrazellulären Komponenten aus dem Inneren der Trägerstruktur verhindern. Ein solcher Polyelektrolytkomplex aus Polyanionen und Polykationen kann z. B. aus Protoglykanen und Polylysin aufgebaut werden. Dieser Polyelektrolytkomplex umschließt die vorbereitete Trägerstruktur praktisch vollständig mit einem semipermeablen Häutchen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Implantates aus Zellkulturen, insbesondere Knorpelzellen, wobei die Zellen auf eine resorbierbare dreidimensionale, im wesentlichen formstabile und entsprechend der gewünschten Form des Implantats vorgeformte Trägerstruktur mit einer zusammenhängenden inneren Oberfläche und einem geringen Volumen aufgebracht werden, in den inneren Hohlraum der Trägerstruktur die Zellen eingebracht werden, die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einem Material ummantelt wird, durch das die Nährlösung hindurchdiffundieren kann und die die Zellen aufnehmende Trägerstruktur mit einer Nährlösung zumindest solange perfundiert wird, bis sich zumindest teilweise eine die Zellen aneinanderbindende interzelluläre Matrix ausgebildet hat, dadurch gekennzeichnet, daß in die Trägerstruktur (1) resorbierbare Mikrokörper (4) eingebracht werden, in denen die Gewebebildung beeinflussende Faktoren aufgenommen sind, die ihrerseits bei der allmählichen Resorption der Mikrokörper freigegeben werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikrokörper poröse Mikrokugeln verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß gekennzeichnet, daß die Mikrokörper einen Durchmesser aufweisen, der etwa

demjenigen der Zellen entspricht und etwa zwischen 10 und 200 Mikrometern, vorzugsweise zwischen 20 und 50 Mikrometern, liegt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Material für die Mikrokörper resorbierbare Polymere, vorzugsweise Polylactide, verwendet werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als die Gewebebildung beeinflussende Faktoren entzündungshemmende Faktoren, insbesondere Antibiotika verwendet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Antibiotika Cyclopeptid-Antibiotika, wie Cyclosporin A verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als die Gewebebildung beeinflussende Faktoren rekombinante gewebsmorphogene Proteine verwendet werden.

8. Verfahren insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in die Trägerstruktur (1) ein die Redifferenzierung von intensiv vermehrten Zellen beeinflussendes Fremdmaterial eingegeben wird, insbesondere ein Hydrogel aus extrazellulären Matrixkomponenten.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Fremdmaterial ein Copolymer aus Chondroitin-4-sulfat und Kollagen Typ II und/oder Hyaluronsäure verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Fremdmaterial Kollagene, Proteoglykane, synthetische Polypeptide oder Polysaccharide verwendet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Fremdmaterial extrazellulären Matrixkomponenten analoge Materialien verwendet werden, die gegebenenfalls durch eine spezielle Behandlung, z. B. UV-Strahlung vernetzen.

12. Verfahren insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur mit Polyelektrolytkomplexen ummantelt wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

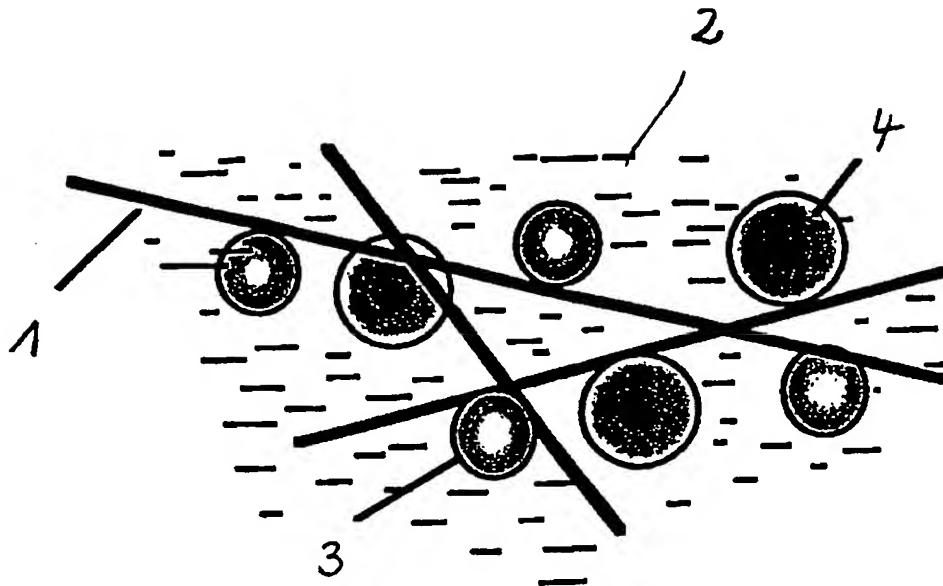
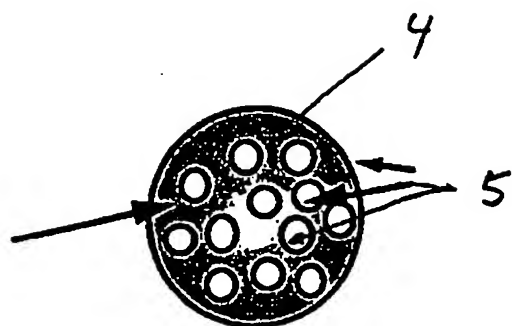


FIG. 1



z. B. 20 - 50
 μm

FIG. 2

Implant prepn. esp. for cartilage repair

Patent Number: DE4431598
Publication date: 1996-03-07
Inventor(s): SITTINGER MICHAEL (DE); BUJIA JESUS DR (DE)
Applicant(s): SITTINGER MICHAEL (DE); BUJIA JESUS DR (DE)
Requested Patent: ☐ DE4431598
Application Number: DE19944431598 19940905
Priority Number(s): DE19944431598 19940905; DE19934306661 19930303
IPC Classification: C12N11/04; C12N5/00
EC Classification: A61L27/38, C12N5/00S
Equivalents:

Abstract

Prepn. of an implant from cell (esp. cartilage cell) cultures comprises: (1) applying the cells to a resorbable, 3-dimensional, shape-stable carrier structure conforming to the shape of the required implant, the carrier having an associated internal surface and small vol.; (2) inserting the cells into the inner cavities of the carrier; (3) coating the cell-loaded carrier with a material that allows diffusion of nutrient soln. through, and (4) perfusing the nutrient soln. for long enough to cause formation of an intercellular matrix that binds the cells together. The new feature is that resorbable microparticles (MP) are included in the carrier, and MP are loaded with a factor (A) that modifies tissue formation. (A) is released as the MP are gradually resorbed.

Data supplied from the esp@cenet database - I2